

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 juillet 2001 (26.07.2001)

(10) Numéro de publication internationale
PCT
WO 01/53303 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C07F 7/08 (74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; Cabinet ORES, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR01/00139 (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 17 janvier 2001 (17.01.2001) (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 00/00695 20 janvier 2000 (20.01.2000) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BEN-NETAU, Bernard [FR/FR]; 45, rue Porte-Bonheur, F-33400 Talence (FR). BOUSBAA, Jamal [—/FR]; 251, chemin de Suzon, F-33400 Talence (FR). CHOPLIN, Franck [FR/FR]; Le Logis, F-72320 Valennes (FR).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: ORGANOSILICON COMPOUNDS, PREPARATION METHOD AND USES THEREOF

WO 01/53303 A1 (54) Titre : COMPOSES ORGANOSILICIÉS, LEUR PROCÉDE DE PREPARATION ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns organosilicon compounds, their method of preparation and their use as coupling agents for depositing, at the surface of a solid support, an organised self-assembled monolayer. The invention also concerns a method for obtaining solid supports whereof the surface is modified by an organised self-assembled monolayer comprising a system of said organosilicon compounds, and the use of said solid supports for biomolecular synthesis or immobilisation.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à des composés organosiliciés, à leur procédé de préparation et à leur utilisation comme agents de couplage pour déposer, à la surface d'un support solide, une monocouche auto-assemblée organisée. La présente invention se rapporte également à un procédé d'obtention de supports solides dont la surface est modifiée par une monocouche auto-assemblée organisée qui comprend un réseau desdits composés organosiliciés, et à l'utilisation desdits supports solides pour la synthèse ou l'immobilisation de biomolécules.

COMPOSES ORGANOSILICIÉS, LEUR PROCÉDE DE PREPARATION ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention se rapporte à des composés organosiliciés, à leur procédé de préparation et à leur utilisation pour déposer une monocouche autoassemblée de ces composés à la surface d'un support solide. La présente invention se rapporte également aux supports solides ainsi modifiés et à leur procédé d'obtention, ainsi qu'à leur utilisation pour la synthèse ou l'immobilisation de biomolécules.

Une monocouche autoassemblée organisée (aussi appelée SAM : « Self-Assembled Monolayer ») est définie comme un assemblage de molécules dans lequel les molécules sont organisées, organisation due à des interactions entre les chaînes des molécules, donnant lieu à un film anisotrope stable, monomoléculaire et ordonné (A. ULMAN, *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1533-1554).

Ces monocouches autoassemblées, que l'on peut obtenir de façon reproductible (J.B. BROZSKA *et al.*, *Langmuir*, 1994, 10, 4367-4373), ont la particularité de former un film dense, homogène et résistant aux traitements chimiques (acide ou basique).

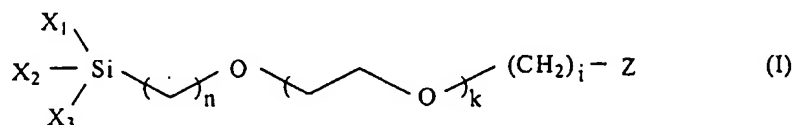
La formation de SAM sur des supports solides, en utilisant l'octadécyltrichlorosilane par exemple, permet la préparation de surfaces organiques homogènes et de paramètres bien définis à la fois chimiquement et structurellement. Ces surfaces peuvent servir de modèles à deux dimensions pour des études fondamentales, notamment en ce qui concerne les phénomènes d'autoassemblage et la chimie des interfaces (A. ULMAN, *ibid*).

Divers composés organosiliciés ont été utilisés comme agents de couplage pour la fonctionnalisation de supports solides (L. A. CHRISSEY *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1996, 24, 15, 3031-3039, U. MASKOS *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1992, 20, 7, 1679-1684) dans le but d'immobiliser ou de synthétiser *in situ* des oligonucléotides. Toutefois, les agents de couplage organosiliciés utilisés dans ces travaux forment des films inhomogènes et très peu résistants aux traitements chimiques ultérieurs de synthèse ou d'immobilisation d'oligonucléotides. De plus, la formation des films avec ces agents de couplage n'est pas reproductible.

Les Inventeurs se sont donc donnés pour but de pallier les inconvénients de l'art antérieur et de pourvoir à des agents de couplage qui permettent d'obtenir de véritables SAM à la surface de supports solides, à savoir des films monocouche stables dans lesquels les molécules soient autoassemblées et organisées. Les Inventeurs se sont également donné pour but de pourvoir à des agents de couplage

dont le greffage sur des supports solides soit reproductible, tout en rendant possible des synthèses ou des immobilisations de biomolécules à la surface de la monocouche formée sur le support.

La présente invention a pour objet des composés organosiliciés de
5 formule (I)



dans laquelle :

- 10 . n est compris entre 15 et 35, de préférence entre 20 et 25,
 . k est compris entre 0 et 100, de préférence entre 0 et 5,
 . i est un nombre entier supérieur ou égal à 0, de préférence égal à 0
 ou à 1,
 . X_1 , X_2 et X_3 , qui peuvent être identiques ou différents entre eux,
 15 sont sélectionnés dans le groupe constitué par les alkyles saturés en C_1 à C_6 , linéaires ou ramifiés, et les groupements hydrolysables, au moins l'un de X_1 , X_2 ou X_3 représentant un groupement hydrolysable, et
 . si $k = 0$ et $i = 0$, alors Z représente un groupement R_1 ,
 . si $k = 0$ et $i \geq 1$, alors Z représente un groupement $-\text{OR}_1$, $-\text{OCOR}_1$,
 20 $-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{COOR}_1$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, $-\text{SR}_1$ ou un atome d'halogène,
 . si $k \geq 1$ et $i = 0$, alors Z représente un groupement $-\text{R}_1$, $-\text{COR}_1$, $-\text{COOR}_1$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, $-\text{CF}_3$ ou $-(\text{CF}_2)_j\text{CF}_3$, j étant compris entre 1 et 10,
 . si $k \geq 1$ et $i \geq 1$, alors Z représente un groupement $-\text{OR}_1$, $-\text{OCOR}_1$, $-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{COOR}_1$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, $-\text{SR}_1$, $-\text{CF}_3$, $-(\text{CF}_2)_j\text{CF}_3$, j étant tel que défini ci-dessus,
 25 ou un atome d'halogène,
 . R_1 et R_2 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, une chaîne hydrocarbonée éventuellement substituée, saturée ou insaturée et linéaire ou ramifiée, comprenant de 1 à 24 atomes de carbone, ou un groupement aromatique, à la condition que, lorsque $k = i = 0$ et $n = 15$, R_1 est différent
 30 du groupe $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ et, lorsque $k = i = 0$ et $n = 19$, R_1 est différent du groupe $-(\text{CH}_2)_6\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$.

Lorsque Z représente un groupement $-\text{OR}_1$, $-\text{OCOR}_1$ ou $-\text{COOR}_1$, indifféremment des valeurs de i, et lorsque $k \geq 1$, alors il est bien entendu que Z peut

représenter tout groupement résultant de la protection d'une fonction hydroxyle ou acide carboxylique, tels que les groupements protecteurs décrits dans *Protective groups in organic synthesis* (T.W. GREENE *et al.*, 2nd édition, Wiley Interscience), par exemple un groupement protecteur cyclique.

- 5 Au sens de la présente invention, on entend par « aromatique » tout groupement qui possède un ou plusieurs noyaux aryles, par exemple un noyau phényle. On entend par « groupe hydrolysable » tout groupe capable de réagir avec un acide en milieu aqueux de façon à donner les composés X_1H , X_2H ou X_3H .

- 10 De préférence, ledit groupement hydrolysable est sélectionné dans le groupe constitué par les atomes d'halogène, le groupement $-N(CH_3)_2$ et les groupements $-OR$, R étant un groupe alkyle saturé en C_1 à C_6 , linéaire ou ramifié.

En ce qui concerne les groupements Z et les groupements hydrolysables, des atomes d'halogène convenables sont aussi bien le fluor que le chlore, le brome ou l'iode.

- 15 Les composés organosiliciés selon la présente invention présentent avantageusement des fonctionnalités très variées, eu égard à la diversité des groupements Z terminaux utilisables, ces groupements Z pouvant être modifiés et fonctionnalisés à volonté selon les réactions de chimie organique bien connues de l'Homme du métier.

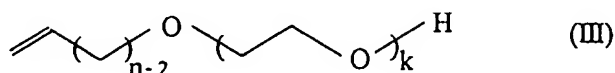
- 20 Selon un mode de réalisation avantageux, un composé de formule (I) est tel que X_1 , X_2 et X_3 représentent des atomes de chlore, n est égal à 22, i est égal à 0, k est égal à 1 ou à 3 et Z représente un groupement $-COCH_3$.

- 25 Selon un autre mode de réalisation avantageux, un composé de formule (I) est tel que X_1 , X_2 et X_3 représentent des atomes de chlore, n est égal à 22, i est égal à 1, k est égal à 2 et Z représente un groupement $-COOCH_3$.

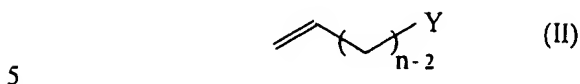
De manière surprenante, les produits sélectionnés permettent effectivement d'obtenir de véritables SAM à la surface de supports solides, à savoir des films monocouche stables dans lesquels les molécules soient autoassemblées et organisées.

- 30 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des composés de formule (I) décrite ci-avant dans laquelle i est différent de 1, procédé qui comprend les étapes suivantes :

a) préparation d'un précurseur insaturé de formule (III) :

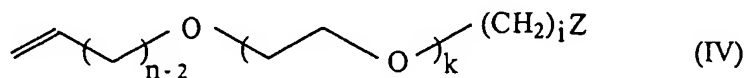


par réaction d'un diol de formule $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_k-\text{H}$ avec un composé insaturé de formule (II) :



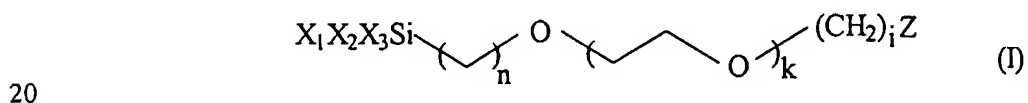
dans lesquelles Y représente un groupe nucléofuge et n et k sont tels que définis ci-avant en rapport avec la formule (I) ;

b) obtention, par fonctionnalisation de l'extrémité hydroxyle du
10 composé de formule (III), d'un précurseur insaturé de formule (IV) :



dans laquelle Z et i sont tels que définis ci-avant en rapport avec la
15 formule (I) ;

c) obtention, par hydrosilylation du précurseur insaturé de formule (IV) à l'aide d'un hydrogénosilane de formule $\text{HSiX}_1\text{X}_2\text{X}_3$, d'un composé silicié de formule (I) :



dans laquelle au moins l'un de X_1 , X_2 et X_3 représente un atome d'halogène ; et

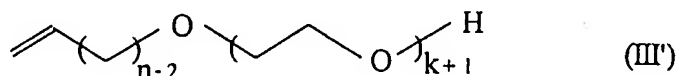
d) éventuellement, obtention d'un autre composé de formule (I) par
25 substitution d'un ou de plusieurs des groupements X_1 , X_2 et X_3 du composé obtenu à l'étape c) à l'aide de groupements X_1 , X_2 et/ou X_3 tels que définis en rapport avec le composé de formule (I) selon la présente invention.

L'étape b) de fonctionnalisation de l'extrémité hydroxyle du composé de formule (III) peut par exemple être réalisée; lorsque i est égal à 0, par une
30 réaction d'estérification à l'aide de chlorure d'alcyle quand Z représente un groupement $-\text{COR}_1$, R_1 étant tel que défini en rapport avec le composé de formule (I) selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des composés de formule (I) selon la présente invention tels que décrits ci-avant, dans laquelle i est égal à 1, procédé qui comprend les étapes suivantes :

a) préparation d'un précurseur insaturé de formule (III') :

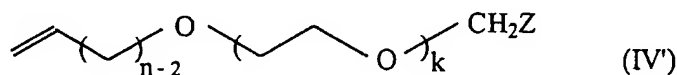
5



par réaction d'un composé insaturé de formule (II) telle que définie ci-dessus avec un diol de formule $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{k+1}-\text{H}$, n et k étant tels que définis ci-avant en rapport avec le composé de formule (I) selon la présente invention ;

10

b) obtention, par oxydation de l'extrémité hydroxyle du composé (III'), d'un précurseur insaturé de formule (IV') :



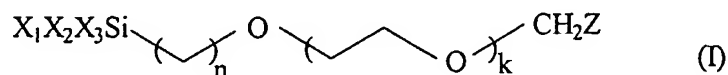
15

dans laquelle Z représente une fonction acide carboxylique ;

c) éventuellement, fonctionnalisation de l'extrémité acide carboxylique du composé de formule (IV') à l'aide d'un autre groupement Z tel que défini en rapport avec la formule (I) des composés selon la présente invention ;

20

d) obtention, par hydrosilylation du précurseur insaturé de formule (IV') à l'aide d'un hydrogénosilane de formule $\text{HSiX}_1\text{X}_2\text{X}_3$, d'un composé silicié de formule (I) :



25

dans laquelle au moins l'un de X_1 , X_2 et X_3 représente un atome d'halogène ; et

e) éventuellement, obtention d'un autre composé de formule (I) par substitution d'un ou de plusieurs des groupements X_1 , X_2 et X_3 du composé obtenu à l'étape d) à l'aide de groupements X_1 , X_2 et/ou X_3 tels que définis en rapport avec le composé de formule (I) selon la présente invention.

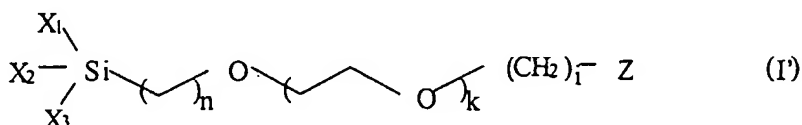
30

Dans les procédés décrits ci-dessus pour la préparation des

composés de formule (I) selon l'invention, quelle que soit la valeur de i , l'étape a) est avantageusement réalisée dans un solvant polaire, par exemple l'eau ou le tétrahydrofurane, en milieu basique et à la température de reflux du solvant ; en tant que groupe nucléofuge Y présent dans le composé de formule (II), on peut par exemple utiliser un atome d'halogène ou un groupe tosyle ; par ailleurs, l'étape d'hydrosilylation du précurseur insaturé peut être réalisée en présence de trichlorosilane.

Les composés organosiliciés de formule (I) selon la présente invention peuvent par exemple être utilisés dans des procédés sol-gel, c'est-à-dire être hydrolysés puis réticulés de façon à obtenir de nouveaux matériaux, ou encore servir de comonomères dans des synthèses de nouveaux polymères dans le but de modifier les propriétés chimiques et mécaniques de ces polymères de par les fonctionnalités introduites, par exemple sous forme de chaînes pendantes. Ils peuvent également être utilisés pour former une monocouche autoassemblée organisée à la surface d'un support solide.

Ainsi, la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un composé organosilicié de formule générale (I') :



20

dans laquelle :

- . n est compris entre 15 et 35,
- . k est compris entre 0 et 100,
- . i est un nombre entier supérieur ou égal à 0,
- . X_1 , X_2 et X_3 , qui peuvent être identiques ou différents entre eux, sont sélectionnés dans le groupe constitué par les alkyles saturés en C_1 à C_6 , linéaires ou ramifiés, et les groupements hydrolysables, au moins l'un de X_1 , X_2 ou X_3 représentant un groupement hydrolysable, et
- . si $k = 0$ et $i = 0$, alors Z représente un groupement R_1 ,
- . si $k = 0$ et $i \geq 1$, alors Z représente un groupement $-\text{OR}_1$, $-\text{OCOR}_1$, $-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{COOR}_1$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, $-\text{SR}_1$ ou un atome d'halogène,
- . si $k \geq 1$ et $i = 0$, alors Z représente un groupement $-\text{R}_1$, $-\text{COR}_1$,

30

-COOR₁, -CONR₁R₂, -CF₃ ou -(CF₂)_jCF₃, j étant compris entre 1 et 10,

. si $k \geq 1$ et $i \geq 1$, alors Z représente un groupement -OR₁, -OCOR₁, -NR₁R₂, -COOR₁, -CONR₁R₂, -SR₁, -CF₃, -(CF₂)_jCF₃, j étant tel que défini ci-dessus, ou un atome d'halogène,

5 . R₁ et R₂, qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, une chaîne hydrocarbonée éventuellement substituée, saturée ou insaturée et linéaire ou ramifiée, comprenant de 1 à 24 atomes de carbone, ou un groupement aromatique,

10 pour former, à la surface d'un support solide, une monocouche autoassemblée organisée.

L'utilisation des composés organosiliciés de formule générale (I') permet avantageusement de modifier la surface de supports solides par une monocouche dense et organisée, qui répond à la définition des SAM donnée précédemment. La monocouche ainsi formée sur la surface présente une grande
15 résistance vis-à-vis des traitements chimiques (acides ou basiques). La robustesse et l'homogénéité de la monocouche formée à la surface du support par les agents organosiliciés selon la présente invention permettent par exemple de traiter des supports contre la corrosion.

Les composés greffés sur le support donnent lieu à des liaisons
20 covalentes fortes, de type siloxanique, avec la surface et développent une forte cohésion entre leurs chaînes alkyles, résultat d'un autoassemblage des molécules qui protège les liaisons siloxaniques. En outre, le greffage est reproductible et les groupements Z des composés greffés présentent une grande réactivité chimique.

La présente invention a également pour objet un support solide dont
25 la surface est modifiée par une monocouche autoassemblée organisée, caractérisé en ce que ladite monocouche comprend un réseau d'au moins un composé organosilicié de formule générale (I') telle que définie ci-avant.

Au sens de la présente invention, on entend par « réseau » un
assemblage de molécules dans lequel les molécules sont organisées et dans lequel les
30 chaînes des molécules interagissent entre elles par des liaisons covalentes ou non (forces de Van der Waals par exemple).

Il est bien entendu que ladite monocouche, outre des composés organosiliciés de formule générale (I') selon la présente invention, peut également comprendre tout autre type de composé capable d'être greffé sur le support solide
35 (obtention d'une monocouche dite « mixte »), ce qui permet de diminuer la densité des composés de formule (I') sur le support, lorsqu'un tel effet est recherché.

Des supports solides convenables sont ceux dont la surface est hydratée. De préférence, ledit support solide est tel que sa surface présente, avant d'être modifiée, des groupements hydroxyles. Il est avantageusement sélectionné dans le groupe constitué par les verres, les céramiques (de préférence de type oxyde), les métaux (par exemple l'aluminium ou l'or) et les métalloïdes (tel que le silicium oxydé).

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'un support solide tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 a) élimination des contaminants du support solide et hydratation et/ou hydroxylation de sa surface,
- b) introduction, sous atmosphère inerte, d'au moins un composé organosilicié de formule générale (I') telle que définie ci-avant dans un mélange d'au moins deux solvants comprenant au moins un solvant hydrocarboné non polaire,
- 15 c) silanisation du support obtenu à l'étape a) par immersion dans la solution préparée à l'étape b), et
- d) rinçage du support modifié obtenu à l'étape c) à l'aide d'un solvant, de préférence polaire.

Par « contaminants » du support solide, on entend tout composé tel que de la graisse, des poussières ou autres, présent à la surface du support et qui ne fait pas partie de la structure chimique du support lui-même.

Le procédé selon l'invention permet avantageusement de modifier chimiquement les propriétés d'une surface minérale, et ce en fonction des groupes Z introduits par les composés organosiliciés greffés sur la surface.

25 De façon particulièrement avantageuse, selon la nature du support solide, l'étape a) est effectuée à l'aide d'un ou de plusieurs solvants et/ou oxydants et/ou hydroxylants (par exemple un mélange sulfochromique), d'un détergent (par exemple du Hellmanex®), d'un traitement photochimique à l'ozone ou tout autre traitement approprié.

30 L'étape b) peut avantageusement être réalisée dans un mélange d'au moins un solvant hydrocarboné non polaire et d'au moins un solvant polaire. Dans ce cas, les proportions volumiques du solvant non polaire par rapport au solvant polaire sont de préférence comprises entre 70/30 et 95/5. A titre d'exemples et de façon non limitative, un solvant hydrocarboné non polaire utilisable est le cyclohexane et un solvant polaire utilisable est le chloroforme.

La concentration du composé organosilicié dans le mélange de

solvants, à l'étape b) du procédé selon la présente invention, est avantageusement comprise entre 1.10^{-5} et 1.10^{-2} mole/litre.

L'étape c) de silanisation du support peut être effectuée pendant un temps compris entre 1 minute et 3 jours et à une température comprise entre -10°C et 120°C selon les solvants utilisés.

Les supports solides dont la surface est modifiée par une monocouche autoassemblée organisée selon la présente invention peuvent avantageusement être utilisés, en fonction de la nature du groupe terminal Z, en tant que supports pour la synthèse ou l'immobilisation de biomolécules, par exemple des oligonucléotides ou des protéines.

Ainsi, la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un support solide tel que décrit ci-avant pour la synthèse ou l'immobilisation de biomolécules par liaison covalente.

La présente invention a plus particulièrement pour objet un procédé de synthèse de biomolécules sur un support solide tel que décrit ci-avant, caractérisé en ce que lesdites biomolécules sont constituées d'un enchaînement d'unités répétitives et en ce que ledit procédé comprend des étapes successives de greffage desdites unités répétitives, la première unité répétitive greffée portant une fonction réactive vis-à-vis des groupements Z des composés organosiliciés présents sur le support solide.

La présente invention a, en outre, pour objet un procédé d'immobilisation de biomolécules sur un support solide tel que décrit ci-avant, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de greffage desdites biomolécules, qui portent des fonctions réactives vis-à-vis des groupements Z des composés organosiliciés, sur ledit support solide.

Avant de mettre en œuvre les procédés de synthèse ou d'immobilisation de biomolécules décrits ci-dessus, et dans le cas où la fonction terminale Z des composés organosiliciés est par exemple un groupement $-\text{OCOR}_1$ (dans lequel R_1 est tel que défini en rapport avec la formule (I') des composés selon la présente invention) ou un groupement $-\text{COOR}_1$ (dans lequel R_1 est tel que défini en rapport avec la formule (I') des composés selon la présente invention, mais est différent d'un atome d'hydrogène), la fonction alcool ou acide carboxylique correspondante peut être préalablement déprotégée, si nécessaire, par un traitement chimique approprié, tel que de la potasse 0,5 M dans un mélange eau/éthanol.

Outre les applications qui viennent d'être évoquées ci-dessus, les supports solides selon la présente invention peuvent également être utilisés, à titre

d'exemples et de façon non limitative, pour greffer des catalyseurs sur des supports minéraux, ou dans le domaine de la chimie combinatoire pour réaliser des synthèses chimiques variées sur supports solides. Ils peuvent également subir des modifications chimiques ultérieures : par exemple, un traitement avec des amines d'un support
5 solide sur lequel sont greffés des composés organosiliciés bromés selon la présente invention permet d'obtenir une surface aux propriétés biocides.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de synthèse de composés organosiliciés selon la présente invention et de
10 modification de supports solides par une monocouche autoassemblée organisée de ces composés organosiliciés, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1, 2 et 3 illustrent la synthèse de précurseurs insaturés des composés organosiliciés selon la présente invention,
- la figure 4 illustre la silylation de ces précurseurs insaturés,
- 15 - la figure 5 représente des spectres infra-rouge réalisés après trois expériences de greffage du composé organosilicié 14 sur des substrats Au/Si/SiO₂, et
- la figure 6a représente la densité, analysée par spectroscopie Raman, de la surface du substrat Au/Si/SiO₂ sur lequel sont greffés les composés organosiliciés 14 ; les figures 6b et 6c représentent les spectres Raman pris en deux
20 points différents de cette surface.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

25 **EXEMPLE 1 : Synthèse de composés organosiliciés de formule (I).**

1) Synthèse d'un alcool insaturé (figure 1).

• *Préparation du magnésien 2*

Dans un ballon tricol de 500 ml, sous atmosphère inerte, est introduit du magnésium (1,8 g; 70 mmol). Le dérivé bromé insaturé 1 (16,3 g; 70 mmol),
30 préalablement mis en solution dans 70 ml de THF (tétrahydrofurane) anhydre, est ajouté goutte à goutte. Quelques gouttes de dibromoéthane peuvent être nécessaires pour activer le magnésium. Le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 1 h 30 afin d'obtenir le magnésien 2, qui sera utilisé immédiatement.

• *Préparation de l'alcoolate de lithium 4*

35 Dans un ballon tricol sec de 250 ml, sous atmosphère inerte, le bromo-alcool 3 (17,7 g; 70 mmol; 1 éq.) est mis en solution dans 70 ml de THF

anhydre. La solution est refroidie à -78°C puis du méthyllithium (50 ml; 80 mmol; 1,1 éq.) est ajouté goutte à goutte. On obtient l'alcoolate de lithium 4.

• *Préparation de l'alcool insaturé 5*

Le magnésien 2 est refroidi à -78°C , puis de l'iodure de cuivre (1,1 g; 3,5 mmol; 0,05 éq.) est ajouté. La solution est agitée pendant 25 minutes à -78°C , puis réchauffée à température ambiante jusqu'à obtenir une couleur pourpre. La solution est alors immédiatement refroidie à -78°C et l'alcoolate de lithium 4 est introduit à l'aide d'une canule sous atmosphère d'argon. La solution est agitée pendant 1 h à -78°C puis pendant 18 h à température ambiante. L'excès de méthyllithium est détruit par addition d'éthanol, suivie d'une hydrolyse en milieu acide par addition d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10%. La phase organique est extraite trois fois à l'éther diéthylique. Les phases étherées sont rassemblées, lavées avec une solution d'acide chlorhydrique à 10%, à l'eau et enfin avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 . La phase organique est ensuite lavée jusqu'à neutralité, séché sur MgSO_4 puis concentrée sous vide. Le produit est purifié par réprécipitation dans l'acétone. Le composé 5 est obtenu sous la forme d'un solide blanc (19,8 g; point de fusion de $61,7\text{--}62,8^{\circ}\text{C}$; rendement de 87%). Son analyse par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

IR (ν (cm^{-1})): 3330; 3079; 2919; 2851; 1642.

RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 6,0-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 3,6 (t; 2 H); 2,2-1,9 (m; 2 H) et 1,7-1,2 (m; 37 H dont 1 H échangeable à D_2O).

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 139,3; 113,8; 62,8; 33,6-25,8 (19 CH_2).

2) Introduction d'un éthylène glycol (figure 2).

• *Synthèse du dérivé chloré insaturé 6*

L'alcool 5 obtenu précédemment (15 g; 46 mmol; 1 éq.) et de la pyridine (40,36 ml; 6 mmol; 0,1 éq.) sont introduits dans un ballon bicol de 250 ml, équipé d'une agitation magnétique et surmonté d'un réfrigérant ascendant. Du chlorure de thionyle (6 ml; 70 mmol; 1,5 éq.) est alors ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h puis est porté au reflux jusqu'à la disparition complète de la bande OH (suivie par spectroscopie infra-rouge). Le milieu réactionnel est ensuite hydrolysé puis extrait trois fois à l'éther diéthylique. Les phases étherées sont rassemblées, lavées avec une solution d'acide chlorhydrique à 10%, à l'eau, puis avec une solution saturée en NaHCO_3 . La phase étherée est ensuite lavée jusqu'à neutralité, séchée sur MgSO_4 et concentrée sous vide. Le composé 6 est obtenu sous la forme d'un solide jaune, puis est purifié par chromatographie sur silice (éluant: éther de pétrole/éther, v/v 70/30); un solide blanc est obtenu (14 g; point de fusion de $34,1\text{--}$

34,9°C; rendement de 75%). Son analyse par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

IR (dispersion dans KBr) ν (cm⁻¹): 3076; 2917; 2849; 1641.

RMN ¹H (CDCl₃; δ (ppm)): 6,0-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 3,5-3,3 (t; 2 H); 2,2-1,9 (m; 2 H) et 1,7-1,2 (m; 36 H).

RMN ¹³C (CDCl₃; δ (ppm)): 139,2; 113,8; 33,8-25,6 (20 CH₂).

• *Synthèse du dérivé iodé insaturé 7*

Dans un ballon de 250 ml, le composé chloré insaturé 6 (10,6g; 32 mmol) et de l'iodure de sodium (22 g; 140 mmol; 4 éq.) sont solubilisés dans de l'acétone (40 ml). La solution est alors portée au reflux pendant 18 h. Le milieu réactionnel est ensuite extrait à l'éther diéthylique, les phases étherées sont rassemblées puis lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous vide. Le produit est purifié par des précipitations dans l'acétone. Le composé 7 est obtenu sous la forme d'un solide jaune (11g; point de fusion de 41,1-42,0°C; rendement de 81%).

Son analyse par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

IR (dispersion dans KBr) ν (cm⁻¹): 3076; 2917; 2849; 1641.

RMN ¹H (CDCl₃; δ (ppm)): 6,0-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 3,2-3,0 (t; 2 H); 2,2-1,9 (m; 2 H) et 1,7-1,2 (m; 36 H).

RMN ¹³C (CDCl₃; δ (ppm)): 139,2; 113,8; 33,8-25,6 (20 CH₂).

• *Synthèse de l'alcool insaturé 8*

Une solution d'éthylène glycol (11,5 g; 180 mmol; 10 éq.) et de soude préalablement réduite en poudre (3,7 g; 90 mmol; 5 éq.) dans 20 ml de THF anhydre est portée au reflux durant 30 minutes. Le composé iodé 7 (8 g; 18 mmol; 1 éq.) et du tétrabutyl-hydrogénosulfate d'ammonium (0,62 g; 1,8 mmol; 0,1 éq.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est ensuite porté au reflux durant 72 h. Après retour à température ambiante, une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (10%, 50 ml) est introduite. Le milieu réactionnel est ensuite extrait trois fois à l'éther diéthylique; les phases étherées sont rassemblées, lavées deux fois avec une solution d'acide chlorhydrique à 10%, à l'eau, puis avec une solution saturée en NaHCO₃. La phase étherée est ensuite lavée jusqu'à neutralité, séchée sur MgSO₄ et concentrée sous vide. Le solide obtenu est reprecipité dans le dichlorométhane, puis purifié par chromatographie sur silice (éluant: dichlorométane/acétate d'éthyle; v/v: 30/70). Le composé 8 est obtenu sous la forme d'un solide blanc (1,4 g, point de fusion de 61,2-62,4°C; rendement de 21%). Son analyse par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

IR (dispersion dans KBr) ν (cm⁻¹): 3330; 3080; 2917; 2849; 1643.

RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 6,0-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 3,75-3,65 (m; 2H) 3,55-3,4 (m; 4 H); 2,2-1,9 (m; 2 H) et 1,7-1,0 (m; 37 H dont 1 H échangeable à D_2O).

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 139,2; 113,8; 71,7 (2 CH_2); 63,7; 33,6-25,8 (19 CH_2).

• *Synthèse de l'alcool insaturé protégé sous forme d'ester 2*

Dans un ballon bicol de 100 ml, l'alcool insaturé **8** (0,9 g; 2,7 mmol) est mis en suspension dans du dichlorométhane (10 ml) et de la triéthylamine (0,6 ml; 5,4 mmol; 2 éq.). Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C puis du chlorure d'acétyle (0,5 ml; 4 mmol; 1,5 éq.) est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une seringue. Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes à 0°C , puis 1 h 30 à température ambiante. Il est ensuite hydrolysé, puis extrait trois fois à l'éther diéthylique. Les phases étherées sont rassemblées, lavées avec une solution d'acide chlorhydrique à 10%, à l'eau, puis avec une solution saturée en NaHCO_3 . La phase étherée est alors lavée jusqu'à neutralité, séchée sur MgSO_4 et concentrée sous vide. Le composé **2** est obtenu sous la forme d'un solide blanc (0,9 g; rendement de 100%). Son analyse par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

IR (dispersion dans KBr) ν (cm^{-1}): 3080; 2917; 2849; 1742; 1643.

RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 6,0-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 4,25-4,15 (m; 2H); 3,60-3,50 (t; 2 H); 3,45-3,35 (t; 2 H); 2,2-1,9 (m; 5 H) et 1,7-1,0 (m; 36 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 172,0; 139,2; 113,8; 71,5; 68,5; 63,7; 33,6-25,8 (19 CH_2); 21,0.

3) Introduction de trois motifs éthylène glycol (figure 2).

A partir du dérivé iodé insaturé **7** obtenu ci-dessus et de triéthylèneglycol, un alcool insaturé **10** est obtenu, puis estérifié pour obtenir le produit **11**, et ce selon les mêmes protocoles qu'exposés ci-dessus.

L'analyse du produit **10** par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante. IR (dispersion dans KBr) ν (cm^{-1}): 3380; 3079; 2919; 2850; 1641. RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 5,9-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 4,3-4,2 (t; 2H); 3,7-3,4 (m; 10 H); 3,4-3,3 (t; 2 H); 2,2-1,9 (m; 2 H) et 1,7-1,0 (m; 37 H dont 1 H échangeable à D_2O). RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 139,3; 114,0; 71,6-68,2 (6 CH_2); 63,6; 33,6-25,8 (19 CH_2).

L'analyse du produit **11** par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante. IR (dispersion dans KBr) ν (cm^{-1}): 3079; 2919; 2850; 1740; 1641. RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 5,9-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 4,3-4,2 (t;

2H); 3,7-3,4 (m; 10 H); 3,4-3,3 (t; 2 H); 2,2-1,9 (m; 5 H) et 1,7-1,0 (m; 36 H). RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 171,5; 139,3; 114,0; 71,6-68,3 (6 CH_2); 63,6; 33,6-25,8 (19 CH_2); 21,0.

4) Préparation des esters insaturés (figure 3).

5 A partir de l'alcool insaturé 10 obtenu précédemment, l'acide et l'ester correspondants ont été préparés comme suit.

• Préparation de l'acide 12

Dans un ballon tricol de 100 ml, l'alcool insaturé 10 (3 g; 6,6 mmol) est mis en suspension dans 10 ml d'acétone. A cette suspension est ajouté 5 ml de réactif de Jones 2M (BOWDEN *et al.*, *J. Chem. Soc.*, 1946, 39). La suspension est portée au reflux pendant 2 heures. Après retour à température ambiante, l'acétone est évaporée, le solide est filtré puis rincé 5 fois à l'eau et 3 fois à l'acétone refroidie à 0°C. Le solide est ensuite purifié par recristallisation dans un mélange THF/acétone (v/v: 9/1) pour donner le composé 12 sous la forme d'un solide blanc (2,9 g; 10 rendement de 94%). Son analyse par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

IR (dispersion dans KBr) ν (cm^{-1}): 3370; 3080; 2917; 2849; 1707; 1643.

RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 11,2 (s large; 1H); 6,0-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 4,1-4,0 (s; 2 H) 3,6-3,3 (m; 10 H); 2,2-1,9 (m; 2 H) et 1,7-1,0 (m; 36 H).

20 RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 172,1; 139,1; 114,0; 71,6-68,7 (5 CH_2); 63,5; 33,6-25,8 (19 CH_2).

• Préparation de l'ester 13

Dans un ballon tricol de 100 ml, l'acide 12 (2,9 g; 6,4 mmol) est solubilisé dans du toluène anhydre (7 ml) sous atmosphère inerte à 0°C. Du chlorure d'oxalyle (1,22 g; 9,6 mmol; 1,5 éq.) est introduit goutte à goutte puis le mélange est agité à température ambiante pendant deux heures. L'excès de réactif et le solvant sont ensuite évaporés sous vide. Le chlorure d'acyle est stocké temporairement sous argon. Du méthanol (6 ml; 128 mmol; 20 éq.), préalablement distillé sur chlorure de calcium, est ajouté lentement. Le milieu réactionnel est ensuite porté au reflux pendant 18 h avant d'être ramené à température ambiante, puis l'excès de méthanol est évaporé. Le milieu réactionnel est alors extrait trois fois à l'éther diéthylique. Les phases étherées sont rassemblées, lavées avec une solution d'acide chlorhydrique à 10%, à l'eau et avec une solution saturée en NaHCO_3 . La phase étherée est ensuite lavée jusqu'à 35 neutralité, séchée sur MgSO_4 et concentrée sous vide. Le composé 13 est obtenu sous la forme d'un solide blanc, puis est purifié par chromatographie sur silice (éluant :

éther de pétrole/éther, 50/50 en volume). On obtient 300 mg d'un solide blanc (rendement de 10%). Son analyse par infra-rouge et RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

IR (dispersion dans KBr) ν (cm^{-1}): 3080; 2917; 2849; 1742; 1643.

5 RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 6,0-5,7 (m; 1 H); 5,1-4,7 (m; 2 H); 4,1-4,0 (s; 2 H) 3,6-3,3 (m; 13 H); 2,2-1,9 (m; 2 H) et 1,7-1,0 (m; 36 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 171,8; 139,1; 114,0; 71,6-68,7 (5 CH_2); 63,6; 51,7; 33,6-25,8 (19 CH_2).

10 Il est bien entendu qu'en utilisant l'alcool 8 comprenant un seul motif éthylène glycol, les acides et les esters correspondants pourraient également être obtenus selon les mêmes protocoles que décrits ici à partir de l'alcool 10.

5) Silylation des précurseurs insaturés (figure 4).

Dans un schlenk sec, sous atmosphère inerte, l'ester 2 (150 mg; 0,33 mmol) est introduit. Du trichlorosilane fraîchement distillé (0,3 ml; 2,2 mmol; 6 équ.), du toluène anhydre (0,3 ml) ainsi qu'une goutte de catalyseur de Kärsted (PCO 72), commercialisé par ABCR (référence 68478-92-2), sont ajoutés. Le milieu réactionnel est alors porté à 40°C durant 2 h. Après retour à température ambiante, le toluène et l'excès de trichlorosilane sont évaporés sous pression réduite à l'aide d'une pompe à palette (pression de 0,5 mm de Hg). Le composé 14 est obtenu sous la forme d'un solide blanc et est stocké sous argon (rendement de 99%). Il s'agit d'un composé organosilicié de formule (I) selon la présente invention dans laquelle X_1 , X_2 et X_3 représentent des atomes de chlore, n est égal à 22, i est égal à 0, k est égal à 1 et Z représente un groupement $-\text{COCH}_3$.

25 L'analyse du composé 14 par RMN du proton et du carbone 13 est la suivante.

RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 4,25-4,15 (m; 2H); 3,60-3,50 (t; 2 H); 3,45-3,35 (t; 2 H); 2,2-1,9 (s; 3 H) et 1,7-1,0 (m; 42 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 171,0; 71,5; 68,5; 63,7; 31,9-22,3 (21 CH_2); 21,0.

30 En partant du composé 11 obtenu ci-avant et en utilisant le même protocole, on obtient le composé organosilicié 15 correspondant. Il s'agit d'un composé organosilicié de formule (I) selon la présente invention dans laquelle X_1 , X_2 et X_3 représentent des atomes de chlore, n est égal à 22, i est égal à 0, k est égal à 3 et Z représente un groupement $-\text{COCH}_3$. Son analyse par RMN du proton et du carbone 13 est la suivante. RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 4,3-4,2 (t; 2H); 3,7-3,4 (m; 10 H); 3,4-3,3 (t; 2 H); 2,2-1,9 (s; 3 H) et 1,7-0,9 (m; 42 H). RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 171,2;

71,6-68,1 (6 CH_2); 63,6; 31,9-22,3 (21 CH_2); 21,0.

En partant du composé 13 obtenu ci-avant et en utilisant le même protocole, on obtient le composé organosilicié 16 correspondant. Il s'agit d'un composé de formule (I) selon la présente invention dans laquelle X_1 , X_2 et X_3 5 représentent des atomes de chlore, n est égal à 22, i est égal à 1, k est égal à 2 et Z représente un groupement $-\text{COOCH}_3$. Son analyse par RMN du proton et du carbone 13 est la suivante. RMN ^1H (CDCl_3 ; δ (ppm)): 4,1-4,0 (s; 2 H); 3,6-3,3 (m; 13 H); 1,7-0,9 (m; 42 H). RMN ^{13}C (CDCl_3 ; δ (ppm)): 171,0; 71,6-63,8 (6 CH_2); 51,7; 31,9-22,3 (21 CH_2).

10 **EXEMPLE 2**: Silanisation d'un support solide à l'aide d'un composé organosilicié de formule (I) et obtention d'une monocouche autoassemblée organisée.

1) Silanisation du support solide.

Un disque de silicium, oxydé en surface, est utilisé comme substrat.

15 Le disque est nettoyé selon la procédure suivante, afin d'éliminer les contaminants de sa surface et de l'hydrater :

- immersion dans un mélange sulfochromique fraîchement préparé (2,5 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$; 2,5 ml d'eau distillé; 50 ml d'acide sulfurique) pendant 10 minutes,

- sous une hotte à flux laminaire équipée de filtres à poussières, le 20 disque est plongé dans de l'eau permutée et soumis aux ultrasons durant 20 minutes. Ce processus est répété deux fois avec des durées de sonication de 5 et 2 minutes respectivement,

- sous une hotte à flux laminaire équipée de filtres à poussières, le 25 disque est introduit dans le réacteur de silanisation pour être séché, sous atmosphère inerte et filtrée. Le réacteur est plongé pendant 45 minutes dans un bain d'huile à 100°C puis est retiré du bain d'huile et sa température ramenée à 18°C.

Le composé organosilicié 14 obtenu dans l'exemple 1, fraîchement préparé en quantité voulue, sous atmosphère inerte, est solubilisé dans une fraction d'un mélange $\text{C}_6\text{H}_{12}/\text{CCl}_4/\text{CHCl}_3$ (v/v/v: 80/12/8). Le composé organosilicié 14 en 30 solution est ensuite prélevé à la seringue puis introduit dans un schlenck contenant le reste du mélange de solvant dont le volume total a été calculé pour obtenir une solution de silanisation de dilution adéquate (entre 1.10^{-5} et 1.10^{-2} mole/litre). Les solvants ont été préalablement séchés selon des procédures connues en elles-mêmes.

La solution de silanisation est introduite, avec une seringue, dans le 35 réacteur et le disque de silicium reste immergé dans cette solution durant 16 h.

Le disque silanisé est retiré du réacteur, puis plongé dans du

chloroforme (« HPLC grade ») et nettoyé aux ultrasons pendant 2 minutes. Ce processus est ensuite répété une deuxième fois.

2) Caractérisation de la surface modifiée.

On a obtenu ci-dessus un support solide dont la surface est modifiée
5 par le composé 14. Le contrôle du greffage des composés organosiliciés est réalisé en utilisant la spectroscopie infra-rouge et la spectroscopie Raman confocale.

3) Libération des hydroxyles de surface.

Si nécessaire, les hydroxyles de surface peuvent être libérés en utilisant le protocole suivant : le disque silanisé est immergé dans une solution de
10 KOH (0,5 M) dans un mélange eau/éthanol (v/v:1/1) durant 20 minutes. Le disque est ensuite nettoyé aux ultrasons durant 5 minutes dans de l'eau déminéralisée. Ce processus est renouvelé une fois dans l'eau puis une deuxième fois dans le chloroforme.

4) Caractérisation de la surface après libération des hydroxyles.

La figure 5 représente des spectres infra-rouge réalisés après trois
15 expériences de greffage du composé 14 sur le support, selon le protocole donné en 1) et après saponification des esters de surface, comme indiqué ci-dessus. La transmittance figure en ordonnées et la fréquence (cm^{-1}) en abscisses. On remarque que les trois spectres se superposent, avec des pics caractéristiques d'un système
20 organisé à 2917 et à 2850 cm^{-1} . Ainsi, on peut en conclure que le greffage du composé organosilicié sur le support est reproductible et donne lieu à la formation d'une monocouche autoassemblée organisée.

La figure 6 représente des études spectroscopiques Raman de la surface modifiée obtenue ci-dessus. La figure 6a est représentative de la densité de la
25 surface du substrat greffé, les dimensions de la surface figurant en abscisses et en ordonnées (7 mm sur la figure correspondent à 1 μm sur le substrat) et l'échelle des densités étant graduée de 130 à 165 (unités arbitraires). Cette figure démontre l'homogénéité de la surface. Les figures 6b et 6c représentent les spectres Raman pris en deux points différents de la surface du substrat ; les ordonnées représentent des
30 coups par seconde et la fréquence figure en abscisses.

Les spectres infra-rouge et Raman montrent donc sans ambiguïté l'homogénéité du film déposé sur le substrat ainsi que l'organisation des molécules sur la surface, caractéristique d'une monocouche autoassemblée organisée. Le spectre infra-rouge montre également que le greffage du film est parfaitement reproductible.

EXEMPLE 3 : Autre exemple de silanisation d'un support solide à l'aide d'un composé organosilicié de formule (I).

Une lame de verre de microscope est utilisée comme substrat. La lame de verre est nettoyée par immersion dans une solution aqueuse d'Hellmanex® à 2% (commercialisée par Polylabo sous la référence 12240) pendant 2 h à 20°C, puis rinçage abondant à l'eau permutée.

Sous une hotte à flux laminaire équipée de filtres à poussières, la lame de verre est introduite dans le réacteur de greffage pour être séchée, sous atmosphère inerte et filtrée. Le réacteur est plongé pendant 45 minutes dans un bain d'huile à 100°C, puis est retiré du bain d'huile et sa température est ramenée à 18°C.

La solution de silanisation, préparée à l'aide du composé organosilicié 14 comme indiqué dans l'exemple 2, est introduite, avec une seringue, dans le réacteur et la lame de verre reste immergée dans cette solution durant 16 h. Le rinçage du substrat silanisé est effectué comme décrit dans l'exemple 2.

La caractérisation de la surface par spectroscopie infra-rouge et Raman démontrent là encore l'obtention d'une monocouche autoassemblée organisée sur le substrat.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

caractérisés en ce que n est compris entre 20 et 25.

4°) Composés selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que k est compris entre 0 et 5.

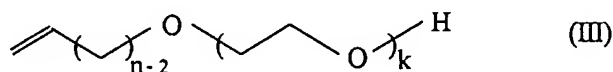
5°) Composés selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que i est égal à 0 ou à 1.

6°) Composés selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que X_1 , X_2 et X_3 représentent des atomes de chlore, n est égal à 22, i est égal à 0, k est égal à 1 ou à 3 et Z représente un groupement $-\text{COCH}_3$.

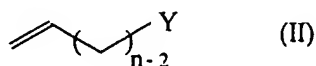
7°) Composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que X_1 , X_2 et X_3 représentent des atomes de chlore, n est égal à 22, i est égal à 1, k est égal à 2 et Z représente un groupement $-\text{COOCH}_3$.

8°) Procédé de préparation des composés de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans laquelle i est différent de 1, qui comprend les étapes suivantes :

a) préparation d'un précurseur insaturé de formule (III) :

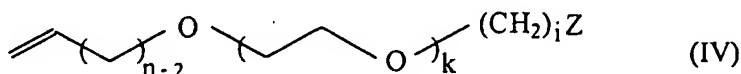


par réaction d'un diol de formule $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_k-\text{H}$ avec un composé insaturé de formule (II) :



dans lesquelles Y représente un groupe nucléofuge et n et k sont tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6 ;

b) obtention, par fonctionnalisation de l'extrémité hydroxyle du composé de formule (III), d'un précurseur insaturé de formule (IV) :

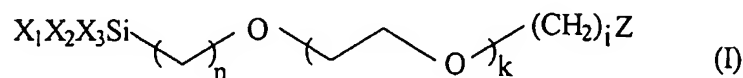


dans laquelle Z et i sont tels que définis dans l'une quelconque des

revendications 1 à 6 ;

c) obtention, par hydrosilylation du précurseur insaturé de formule (IV) à l'aide d'un hydrogénosilane de formule $\text{HSiX}_1\text{X}_2\text{X}_3$, d'un composé silicié de formule (I) :

5



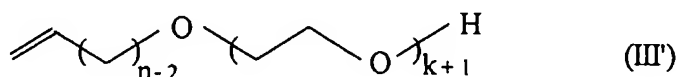
dans laquelle au moins l'un de X_1 , X_2 et X_3 représente un atome d'halogène ; et

10

d) éventuellement, obtention d'un autre composé de formule (I) par substitution d'un ou de plusieurs des groupements X_1 , X_2 et X_3 du composé obtenu à l'étape c) à l'aide de groupements X_1 , X_2 et/ou X_3 tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

9°) Procédé de préparation des composés de formule (I) selon l'une
15 quelconque des revendications 1 à 5 et 7 dans laquelle i est égal à 1, qui comprend les étapes suivantes :

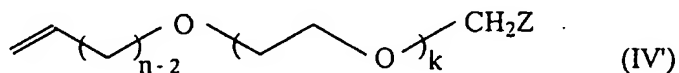
a) préparation d'un précurseur insaturé de formule (III') :



20

par réaction d'un composé insaturé de formule (II) telle que définie dans la revendication 6 avec un diol de formule $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{k+1}-\text{H}$, n et k étant tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 7 ;

b) obtention, par oxydation de l'extrémité hydroxyle du composé
25 (III'), d'un précurseur insaturé de formule (IV') :

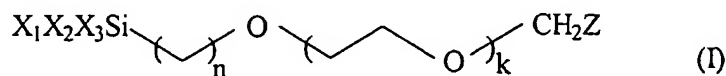


dans laquelle Z représente une fonction acide carboxylique ;

30

c) éventuellement, fonctionnalisation de l'extrémité acide carboxylique du composé de formule (IV') à l'aide d'un autre groupement Z tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 7 ;

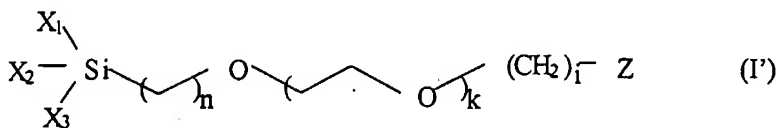
d) obtention, par hydrosilylation du précurseur insaturé de formule (IV') à l'aide d'un hydrogénosilane de formule $\text{HSiX}_1\text{X}_2\text{X}_3$, d'un composé silicié de formule (I) :



dans laquelle au moins l'un de X_1 , X_2 et X_3 représente un atome d'halogène ; et

e) éventuellement, obtention d'un autre composé de formule (I') par substitution d'un ou de plusieurs des groupements X_1 , X_2 et X_3 du composé obtenu à l'étape d) à l'aide de groupements X_1 , X_2 et/ou X_3 tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 7.

10° Utilisation d'un composé de formule (I') :



dans laquelle :

- . n est compris entre 15 et 35,
- . k est compris entre 0 et 100,
- . i est un nombre entier supérieur ou égal à 0,
- . X_1 , X_2 et X_3 , qui peuvent être identiques ou différents entre eux, sont sélectionnés dans le groupe constitué par les alkyles saturés en C_1 à C_6 , linéaires ou ramifiés, et les groupements hydrolysables, au moins l'un de X_1 , X_2 ou X_3 représentant un groupement hydrolysable, et
- . si $k = 0$ et $i = 0$, alors Z représente un groupement R_1 ,
- . si $k = 0$ et $i \geq 1$, alors Z représente un groupement $-\text{OR}_1$, $-\text{OCOR}_1$, $-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{COOR}_1$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, $-\text{SR}_1$ ou un atome d'halogène,
- . si $k \geq 1$ et $i = 0$, alors Z représente un groupement $-\text{R}_1$, $-\text{COR}_1$, $-\text{COOR}_1$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, $-\text{CF}_3$ ou $-(\text{CF}_2)_j\text{CF}_3$, j étant compris entre 1 et 10,
- . si $k \geq 1$ et $i \geq 1$, alors Z représente un groupement $-\text{OR}_1$, $-\text{OCOR}_1$, $-\text{NR}_1\text{R}_2$, $-\text{COOR}_1$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, $-\text{SR}_1$, $-\text{CF}_3$, $-(\text{CF}_2)_j\text{CF}_3$, j étant tel que défini ci-dessus,

ou un atome d'halogène,

R_1 et R_2 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, une chaîne hydrocarbonée éventuellement substituée, saturée ou insaturée et linéaire ou ramifiée, comprenant de 1 à 24 atomes de carbone, ou un

5 groupement aromatique,

pour former, à la surface d'un support solide, une monocouche autoassemblée organisée.

11°) Support solide dont la surface est modifiée par une monocouche autoassemblée organisée, caractérisé en ce que ladite monocouche

10 comprend un réseau d'au moins un composé organosilicié de formule (I') telle que définie dans la revendication 10.

12°) Support selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit support solide est tel que sa surface présente, avant d'être modifiée, des groupements hydroxyles.

13°) Support selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit support solide est sélectionné dans le groupe constitué par les verres, les céramiques, les métaux et les métalloïdes.

14°) Procédé d'obtention d'un support solide selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 a) élimination des contaminants du support solide et hydratation et/ou hydroxylation de sa surface,

b) introduction, sous atmosphère inerte, d'au moins un composé organosilicié de formule (I') telle que définie dans la revendication 10 dans un mélange d'au moins deux solvants comprenant au moins un solvant hydrocarboné non

25 polaire,

c) silanisation du support obtenu à l'étape a) par immersion dans la solution préparée à l'étape b), et

d) rinçage du support modifié obtenu à l'étape c) à l'aide d'un solvant.

15°) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape a) est effectuée, selon la nature du support solide, à l'aide d'un ou de plusieurs solvants et/ou oxydants et/ou hydroxylants, d'un détergent ou d'un traitement photochimique à l'ozone.

16°) Procédé selon la revendication 14 ou la revendication 15, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée dans un mélange d'au moins un solvant hydrocarboné non polaire et d'au moins un solvant polaire.

35

17°) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que les proportions volumiques de solvant non polaire et de solvant polaire sont comprises entre 70/30 et 95/5.

18°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la concentration du composé organosilicié dans le mélange de solvants, à l'étape b) du procédé, est comprise entre 1.10^{-5} et 1.10^{-2} mole/litre.

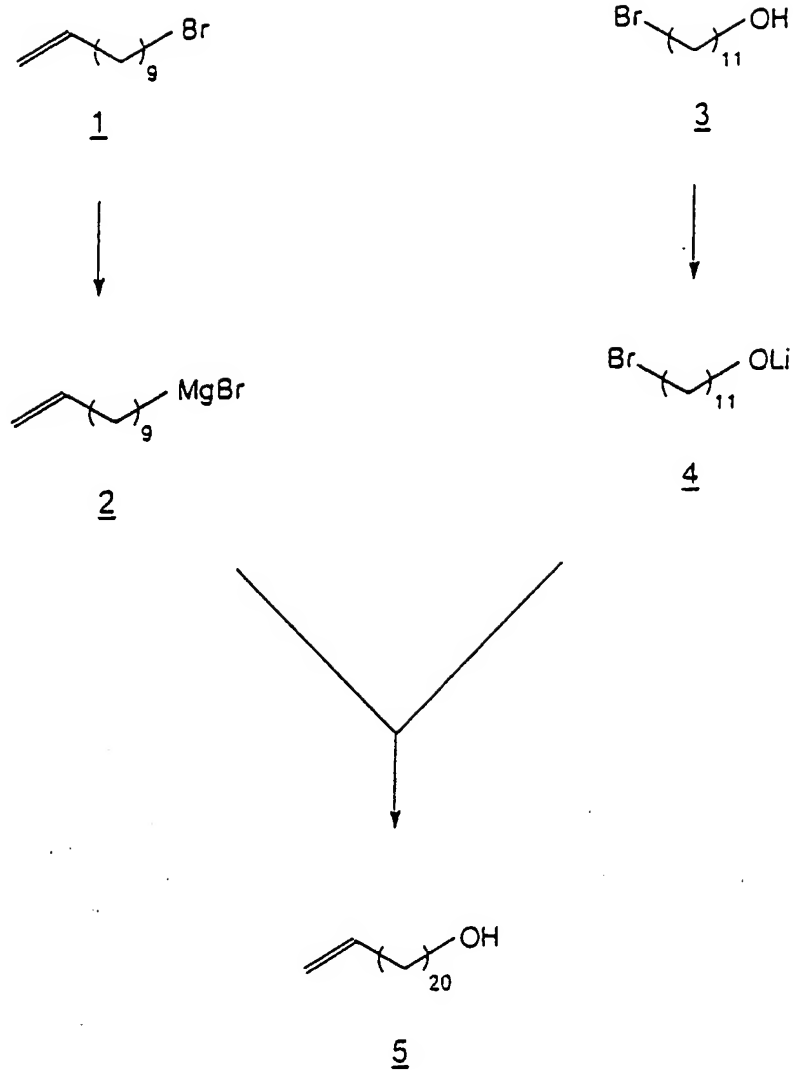
19°) Utilisation d'un support solide selon l'une quelconque des revendications 11 à 13 pour la synthèse ou l'immobilisation de biomolécules par liaison covalente.

20°) Procédé de synthèse de biomolécules sur un support solide selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que lesdites biomolécules sont constituées d'un enchaînement d'unités répétitives et en ce que ledit procédé comprend des étapes successives de greffage desdites unités répétitives, la première unité répétitive greffée portant une fonction réactive vis-à-vis des groupements Z des composés organosiliciés présents sur le support solide.

21°) Procédé d'immobilisation de biomolécules sur un support solide selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de greffage desdites biomolécules, qui portent des fonctions réactives vis-à-vis des groupements Z des composés organosiliciés, sur ledit support solide.

22°) Procédé selon la revendication 20 ou la revendication 21, caractérisé en ce qu'il est précédé, dans le cas où la fonction terminale Z des composés organosiliciés est un groupement $-OCOR_1$ dans lequel R_1 est tel que défini dans la revendication 10, ou un groupement $-COOR_1$ dans lequel R_1 est tel que défini dans la revendication 10 et est différent d'un atome d'hydrogène, d'une étape de déprotection de la fonction alcool ou acide carboxylique correspondante par un traitement chimique approprié.

1/6

FIGURE 1

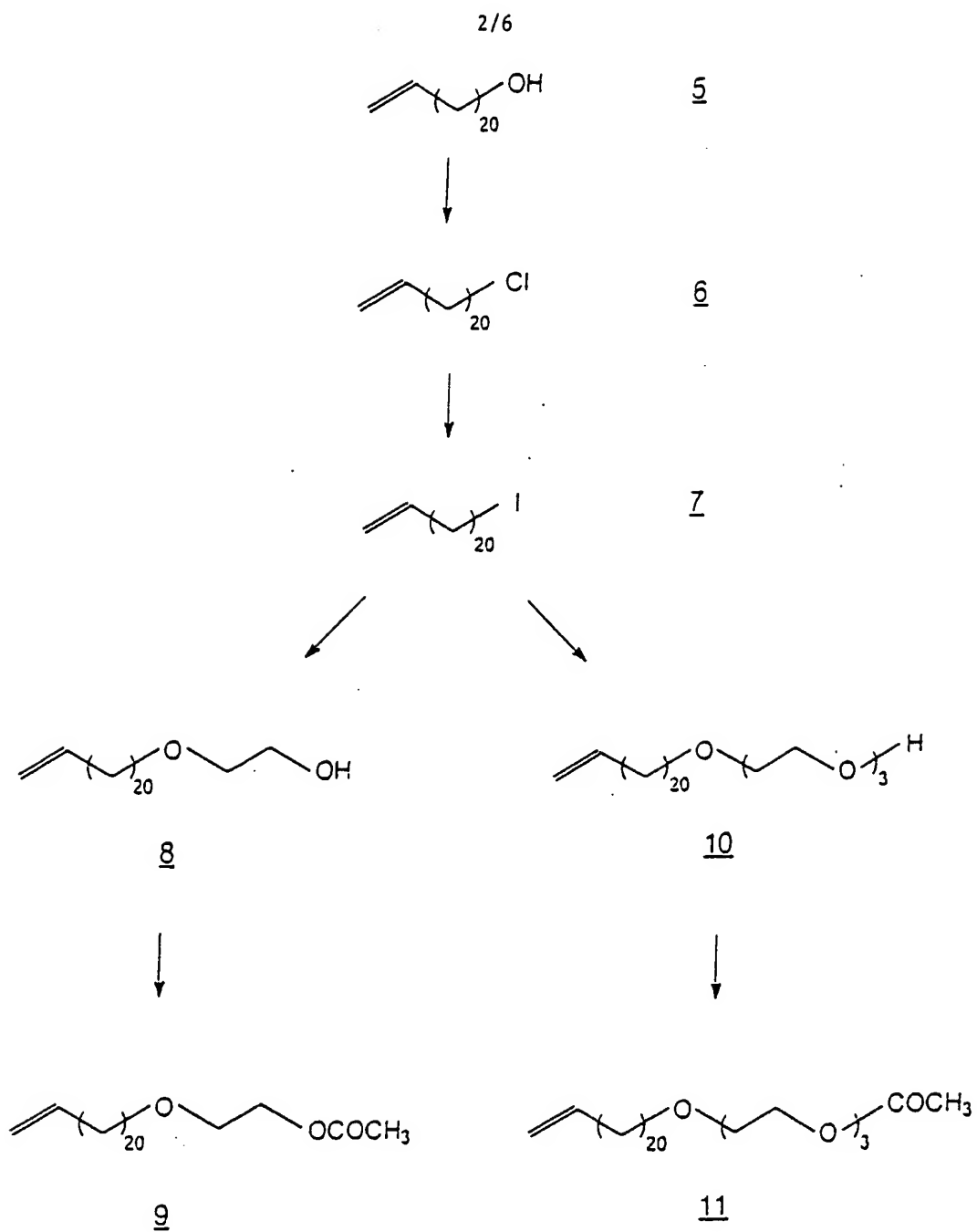
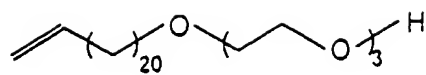
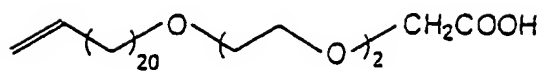
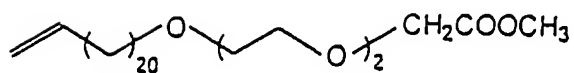
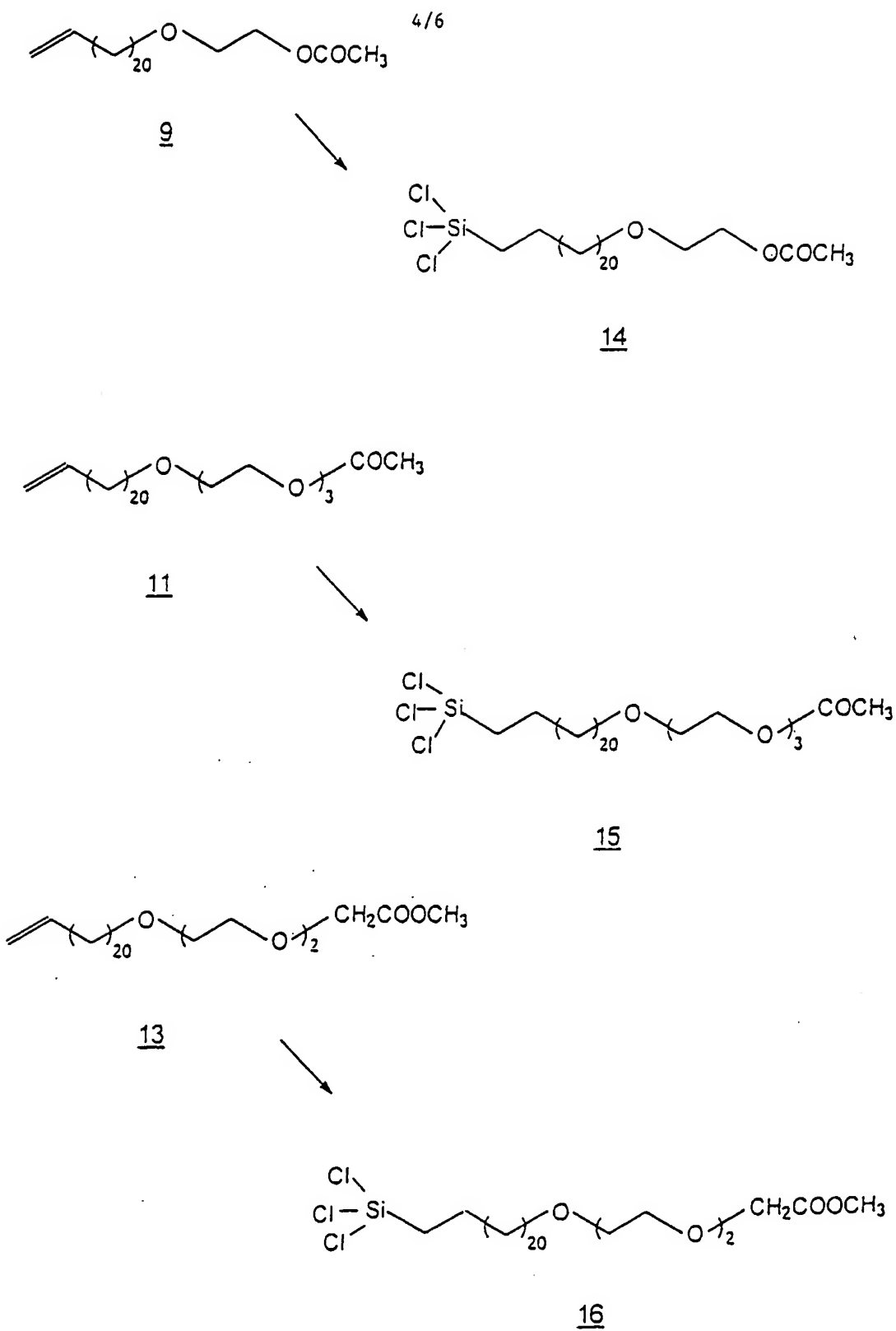


FIGURE 2

3/6

101213FIGURE 3

FIGURE 4

5/6

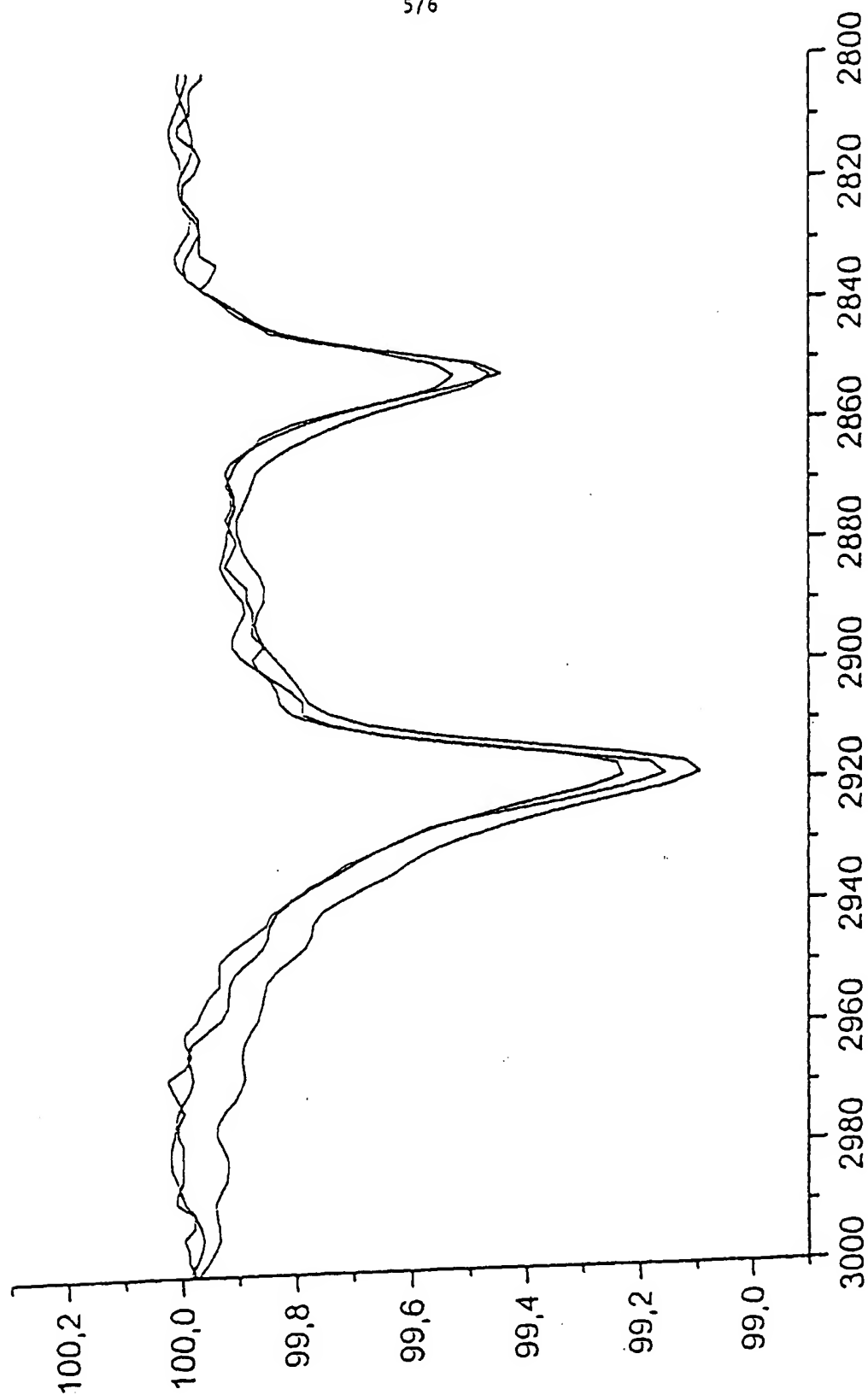
FIGURE 5

Figure 6b

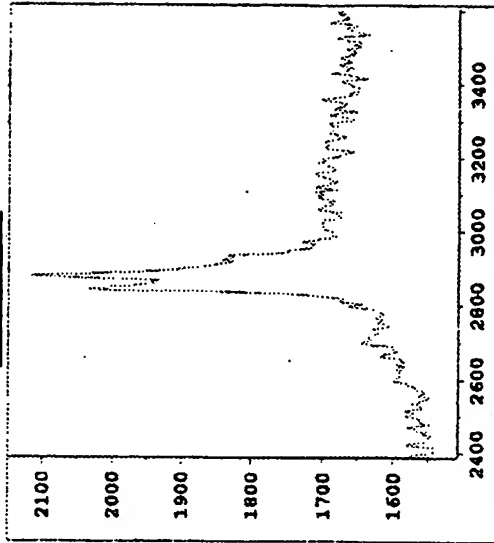
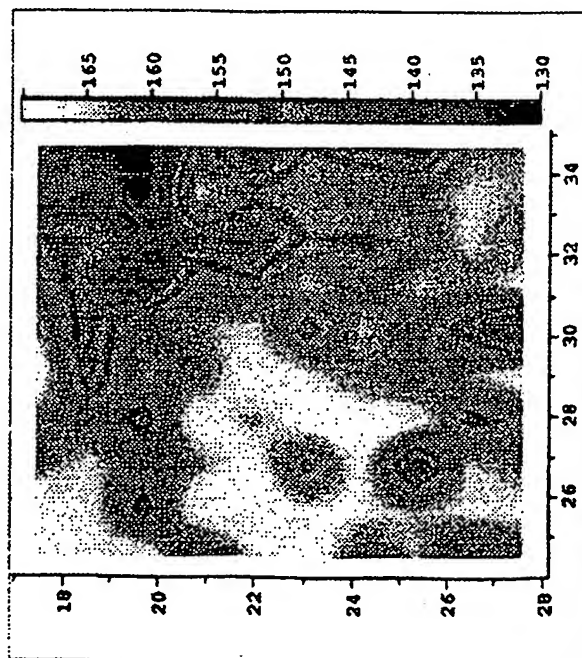
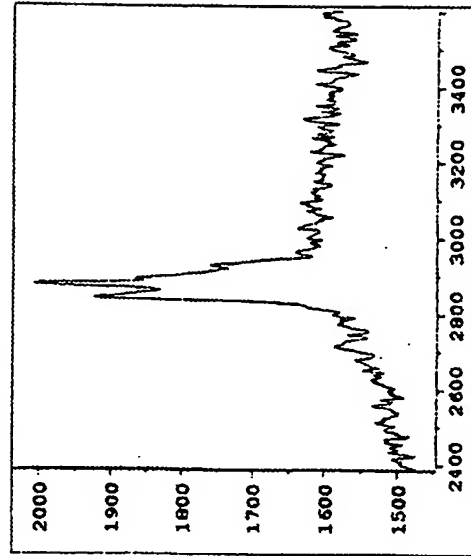


Figure 6c



— 1 μ

Figure 6a

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/FR 01/00139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07F7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | EP 0 482 613 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 29 April 1992 (1992-04-29) examples 1-4 --- | 1,2 |
| X | EP 0 552 637 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 28 July 1993 (1993-07-28) examples 1-11 --- | 1,2 |
| X | EP 0 629 673 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 21 December 1994 (1994-12-21) page 8, line 23 - line 38; examples 1-16 --- | 1,2 |
| X | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 09, 30 July 1999 (1999-07-30) & JP 11 092251 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD), 6 April 1999 (1999-04-06) abstract --- -/- | 1,2 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.*** Special categories of cited documents:*****A*** document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance***E*** earlier document but published on or after the international filing date***L*** document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)***O*** document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means***P*** document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed***T*** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention***X*** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone***Y*** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.***Z*** document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2001

Date of mailing of the international search report

05/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bader, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/00139

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | <p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 05, 30 June 1995 (1995-06-30) & JP 07 051355 A (KURARAY CO LTD), 28 February 1995 (1995-02-28) abstract</p> <p>-----</p> | 1, 10, 11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/00139

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0482613 A | 29-04-1992 | CA 2054106 A | 26-04-1992 |
| | | DE 69128688 D | 19-02-1998 |
| | | DE 69128688 T | 23-04-1998 |
| | | JP 2500824 B | 29-05-1996 |
| | | JP 5031441 A | 09-02-1993 |
| | | KR 9511183 B | 29-09-1995 |
| | | US 5538762 A | 23-07-1996 |
| | | US 5240774 A | 31-08-1993 |
| EP 0552637 A | 28-07-1993 | JP 2090503 C | 18-09-1996 |
| | | JP 5186531 A | 27-07-1993 |
| | | JP 8000846 B | 10-01-1996 |
| | | DE 69322176 D | 07-01-1999 |
| | | DE 69322176 T | 22-04-1999 |
| | | US 5270417 A | 14-12-1993 |
| EP 0629673 A | 21-12-1994 | JP 2500149 B | 29-05-1996 |
| | | JP 7009608 A | 13-01-1995 |
| | | JP 4239633 A | 27-08-1992 |
| | | JP 4249146 A | 04-09-1992 |
| | | JP 7086146 B | 20-09-1995 |
| | | JP 2500150 B | 29-05-1996 |
| | | JP 4255343 A | 10-09-1992 |
| | | JP 2622316 B | 18-06-1997 |
| | | JP 4359031 A | 11-12-1992 |
| | | EP 0864622 A | 16-09-1998 |
| | | DE 69120788 D | 14-08-1996 |
| | | DE 69120788 T | 07-11-1996 |
| | | DE 69218811 D | 15-05-1997 |
| | | DE 69218811 T | 17-07-1997 |
| | | EP 0493747 A | 08-07-1992 |
| | | EP 0497189 A | 05-08-1992 |
| | | EP 0867490 A | 30-09-1998 |
| | | JP 2809889 B | 15-10-1998 |
| | | JP 4288349 A | 13-10-1992 |
| | | KR 9615626 B | 18-11-1996 |
| | | KR 9608915 B | 09-07-1996 |
| | | US 5407709 A | 18-04-1995 |
| | | US 5437894 A | 01-08-1995 |
| | | US 5284707 A | 08-02-1994 |
| | | US 5324566 A | 28-06-1994 |
| | | JP 10310455 A | 24-11-1998 |
| | | JP 10309768 A | 24-11-1998 |
| | | JP 3017965 B | 13-03-2000 |
| | | JP 10146920 A | 02-06-1998 |
| | | JP 2000103007 A | 11-04-2000 |
| | | KR 9702941 B | 13-03-1997 |
| JP 11092251 A | 06-04-1999 | NONE | |
| JP 07051355 A | 28-02-1995 | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

No
PCT/FR 01/00139

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07F7/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| X | EP 0 482 613 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 29 avril 1992 (1992-04-29) exemples 1-4 --- | 1,2 |
| X | EP 0 552 637 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 28 juillet 1993 (1993-07-28) exemples 1-11 --- | 1,2 |
| X | EP 0 629 673 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 21 décembre 1994 (1994-12-21) page 8, ligne 23 - ligne 38; exemples 1-16 --- | 1,2 |
| X | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 09, 30 juillet 1999 (1999-07-30) & JP 11 092251 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD), 6 avril 1999 (1999-04-06) abrégé --- -/- | 1,2 |



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 mars 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bader, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No
PCT/FR 01/00139

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | <p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 05, 30 juin 1995 (1995-06-30) & JP 07 051355 A (KURARAY CO LTD), 28 février 1995 (1995-02-28) abrégé</p> <p>-----</p> | 1, 10, 11 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

de Internationale No

PCT/FR 01/00139

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| EP 0482613 A | 29-04-1992 | CA 2054106 A | 26-04-1992 |
| | | DE 69128688 D | 19-02-1998 |
| | | DE 69128688 T | 23-04-1998 |
| | | JP 2500824 B | 29-05-1996 |
| | | JP 5031441 A | 09-02-1993 |
| | | KR 9511183 B | 29-09-1995 |
| | | US 5538762 A | 23-07-1996 |
| | | US 5240774 A | 31-08-1993 |
| EP 0552637 A | 28-07-1993 | JP 2090503 C | 18-09-1996 |
| | | JP 5186531 A | 27-07-1993 |
| | | JP 8000846 B | 10-01-1996 |
| | | DE 69322176 D | 07-01-1999 |
| | | DE 69322176 T | 22-04-1999 |
| | | US 5270417 A | 14-12-1993 |
| EP 0629673 A | 21-12-1994 | JP 2500149 B | 29-05-1996 |
| | | JP 7009608 A | 13-01-1995 |
| | | JP 4239633 A | 27-08-1992 |
| | | JP 4249146 A | 04-09-1992 |
| | | JP 7086146 B | 20-09-1995 |
| | | JP 2500150 B | 29-05-1996 |
| | | JP 4255343 A | 10-09-1992 |
| | | JP 2622316 B | 18-06-1997 |
| | | JP 4359031 A | 11-12-1992 |
| | | EP 0864622 A | 16-09-1998 |
| | | DE 69120788 D | 14-08-1996 |
| | | DE 69120788 T | 07-11-1996 |
| | | DE 69218811 D | 15-05-1997 |
| | | DE 69218811 T | 17-07-1997 |
| | | EP 0493747 A | 08-07-1992 |
| | | EP 0497189 A | 05-08-1992 |
| | | EP 0867490 A | 30-09-1998 |
| | | JP 2809889 B | 15-10-1998 |
| | | JP 4288349 A | 13-10-1992 |
| | | KR 9615626 B | 18-11-1996 |
| | | KR 9608915 B | 09-07-1996 |
| | | US 5407709 A | 18-04-1995 |
| | | US 5437894 A | 01-08-1995 |
| | | US 5284707 A | 08-02-1994 |
| | | US 5324566 A | 28-06-1994 |
| | | JP 10310455 A | 24-11-1998 |
| | | JP 10309768 A | 24-11-1998 |
| | | JP 3017965 B | 13-03-2000 |
| | | JP 10146920 A | 02-06-1998 |
| | | JP 2000103007 A | 11-04-2000 |
| | | KR 9702941 B | 13-03-1997 |
| JP 11092251 A | 06-04-1999 | AUCUN | |
| JP 07051355 A | 28-02-1995 | AUCUN | |